

学位論文題名

***Kaempferia parviflora* の代謝性疾患に対する  
予防効果および作用機序解明**

Clarification of preventive effect and its mechanism of *Kaempferia parviflora* on metabolic diseases

金沢大学大学院自然科学研究科（博士課程後期）

生命科学専攻

分子作用学講座

堀川 琢心

It was reported that rhizome powder of *Kaempferia parviflora* (Kp) prevented metabolic diseases in spontaneously obese type 2 diabetic mice (TSOD mice), but the mechanism responsible for its anti-obesity effect remains to be elucidated. This study was designed to identify the active compound and the mechanisms of its anti-obesity effect. Ethyl acetate extract of Kp rhizome (KpE) was given to TSOD and TSNO mice for 8 weeks. KpE prevented obesity and improved insulin resistance, glucose metabolism and lipid metabolism. The methanol extract and KpE were subjected to a silica gel chromatography and HPLC using normal phase column. 12 polymethoxyflavonoids were isolated from Kp. KpE and its components, 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone and 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone strongly induced differentiation of 3T3-L1 preadipocyte to adipocyte. The two compounds enhanced the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ , but show no PPAR $\gamma$  ligand activity. These compounds were suggested to regulate the expression of transcription factors mRNA located upstream of PPAR $\gamma$ . In addition, KpE and its components, 5,7,4'-trimethoxyflavone, 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone strongly suppressed lipid accumulation of 3T3-L1 mature adipocyte and enhanced the expression of lipid-degrading enzyme. These results indicated that some of polymethoxyflavonoids contained in Kp may be the active ingredients that shows anti-obesity effect and the action mechanism at least depends on improvement of lipid metabolism.

#### 【背景・目的】

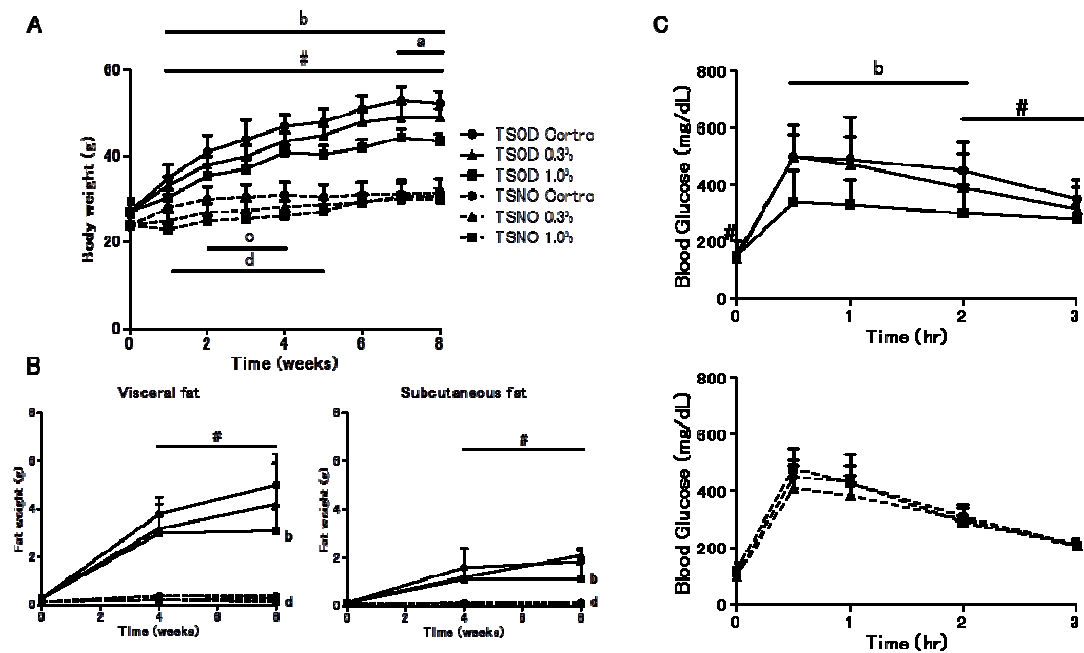
2012 年現在、糖尿病患者は世界中で約 3.71 億人に上る。背景には過栄養やそれに伴う肥満患者の増加が挙げられる。近年では、肥満や脂質異常症、高血圧など、心血管疾患に繋がる危険因子が重複する病態を metabolic syndrome (MS) と呼ばれ、広く知られるようになった。我が国における肥満人口は年々増加していることから、肥満の予防や治療は重要な課題であると言える。そのため現在、MS の予防および治療を目的に、食品や生薬を題材とした研究は多くなされている。*Kaempferia parviflora* Wall Ex Baker (Kp) は東南アジア地域で自生するショウガ科の植物で、現地では滋養強壮や体力回復などを目的に民間薬として広く使用されている伝承生薬である。Kp 根茎末を糖尿病モデル動物 (TSOD マウス) に 2 ヶ月間自由摂取させたところ、抗肥満作用を示したことが報告されている。しかし、その抗肥満作用の機序や活性本体の同定など、詳細な報告は未だなされていない。そこで本研究は、Kp 根茎末で示された効果の作用機序解明を目的として検討を行った。

## 【方法】

Kp 根茎から酢酸エチルエキスを抽出し、TSOD マウスおよび対照マウス (TSNO) に 2 ヶ月間自由摂取させた。体重、摂餌量は 1 週間毎に測定し、4 および 8 週間目に X 線 CT 装置を用い脂肪量を算出した。2 ヶ月間飼育後解剖し、血液中および肝臓中脂質値、血糖値、インスリン値などを測定した。また、Kp MeOH エキスおよび KpE について、Silica gel column chromatography、HPLC を用いて成分探索を行った。そして MS、IR、NMR など分析機器を用いて構造決定を行った。また、マウス由来脂肪前駆細胞 (3T3-L1 細胞) を用いて脂肪細胞に対する効果を検討した。まず、脂肪前駆細胞に対する効果は、細胞が confluent に達した日を day 0 とし、分化誘導剤と各濃度に設定した被験物質を含む培地に交換し、4 日間培養した。その後 2 日毎に培地を交換し、day 8 の細胞および培地上清を sample とした。続いて、成熟脂肪細胞に対する効果は、細胞が confluent に達してから 2 日後を day 0 とし、分化誘導剤を含む培地で 4 日間培養した。その後 2 日毎に培地を交換し、day 8 から被験物質を添加した培地にて 4 日間培養し、day 12 における細胞および培地上清を sample とした。なお、脂肪細胞の形態的変化は Oil red O 染色による光学顕微鏡レベルでの観察で評価した。また、mRNA 発現は real-time PCR、タンパク質発現は ELISA 法、Western blotting 法を用いて評価した。

## 【結果・考察】

肥満マウスモデルにおいて、KpE 投与群では KpE 非投与群に対し、体重増加抑制、内臓脂肪および皮下脂肪蓄積抑制、高血圧改善、血糖値、血漿中インスリン値低下、血漿中 adiponectin 値上昇、耐糖能改善、肝臓中脂質低下などを示し、KpE 中に抗肥満作用を示す活性本体が含まれていることが示唆された (Figure 1, Table 1, 2)。そこで、Kp MeOH エキスおよび KpE について成分探索を行い、12 種のポリメトキシフラボノイドの単離し、構造を決定した (Table 3)。



**Figure 1. The preventive effects of KpE on metabolic diseases in TSOD and TSNO mice.**

**A: body weight, B: accumulation of adipo tissue and C: plasma glucose level in the oral glucose tolerance test in TSOD and TSNO mice.**

The values are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 9)

#Significantly different from the TSNO control group at  $p < 0.05$ .

a,bSignificantly different from the TSOD control group at  $p < 0.05$ .

c,dSignificantly different from the TSNO control group at  $p < 0.05$ .

a: TSOD 0.3%, b: TSOD 1.0%, c: TSNO 0.3%, d: TSNO 1.0%.

**Table 1. The effects of KpE on biochemical parameters of plasma.**

	TSOD			TSNO		
	Control	0.3%	1.0%	Control	0.3%	1.0%
TG (mg/dL)	248 ± 49	282 ± 54	280 ± 66	200 ± 44	151 ± 35	197 ± 75
T-Cho (mg/dL)	160 ± 10 <sup>#</sup>	184 ± 25	168 ± 27	120 ± 22	116 ± 15	116 ± 12
HDL-Cho (mg/dL)	73 ± 17 <sup>#</sup>	76 ± 14	83 ± 35	50 ± 8	43 ± 4	45 ± 5
LDL-Cho (mg/dL)	36 ± 16 <sup>#</sup>	43 ± 13	32 ± 10	22 ± 6	19 ± 3	18 ± 2
Glucose (mg/dL)	216 ± 40 <sup>#</sup>	189 ± 45	153 ± 39 <sup>a</sup>	152 ± 19	156 ± 18	144 ± 21
Insulin (ng/mL)	15.6 ± 6.2 <sup>#</sup>	7.1 ± 2.9 <sup>a</sup>	5.9 ± 4.6 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3	1.8 ± 1.4	1.6 ± 1.0
Adiponectin (µg/mL)	3.3 ± 0.5 <sup>#</sup>	3.7 ± 0.9	4.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	5.5 ± 1.0	5.9 ± 0.6	4.7 ± 0.4

The values are expressed as mean ± SD (n = 9)

<sup>#</sup>Significantly different from the TSNO control group at  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup>Significantly different from the TSOD control group at  $p < 0.05$ .

**Table 2. The effects of KpE on liver weight and lipid content.**

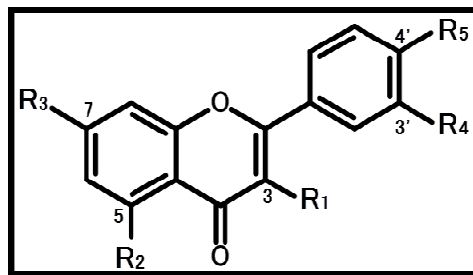
	TSOD			TSNO		
	Control	0.3%	1.0%	Control	0.3%	1.0%
Liver (g)	2.42 ± 0.19 <sup>#</sup>	2.31 ± 0.13	2.16 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.28	1.89 ± 0.24	1.87 ± 0.19
TG (mg/g liver)	14.14 ± 5.36 <sup>#</sup>	9.46 ± 4.57	8.13 ± 3.52 <sup>a</sup>	5.24 ± 2.04	5.27 ± 2.04	6.03 ± 4.40
T-Cho (mg/g liver)	1.81 ± 0.40	1.63 ± 0.49	1.33 ± 0.32 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.19	1.74 ± 0.38	1.38 ± 0.33

The values are expressed as mean ± SD (n = 9)

<sup>#</sup>Significantly different from the TSNO control group at  $p < 0.05$ .

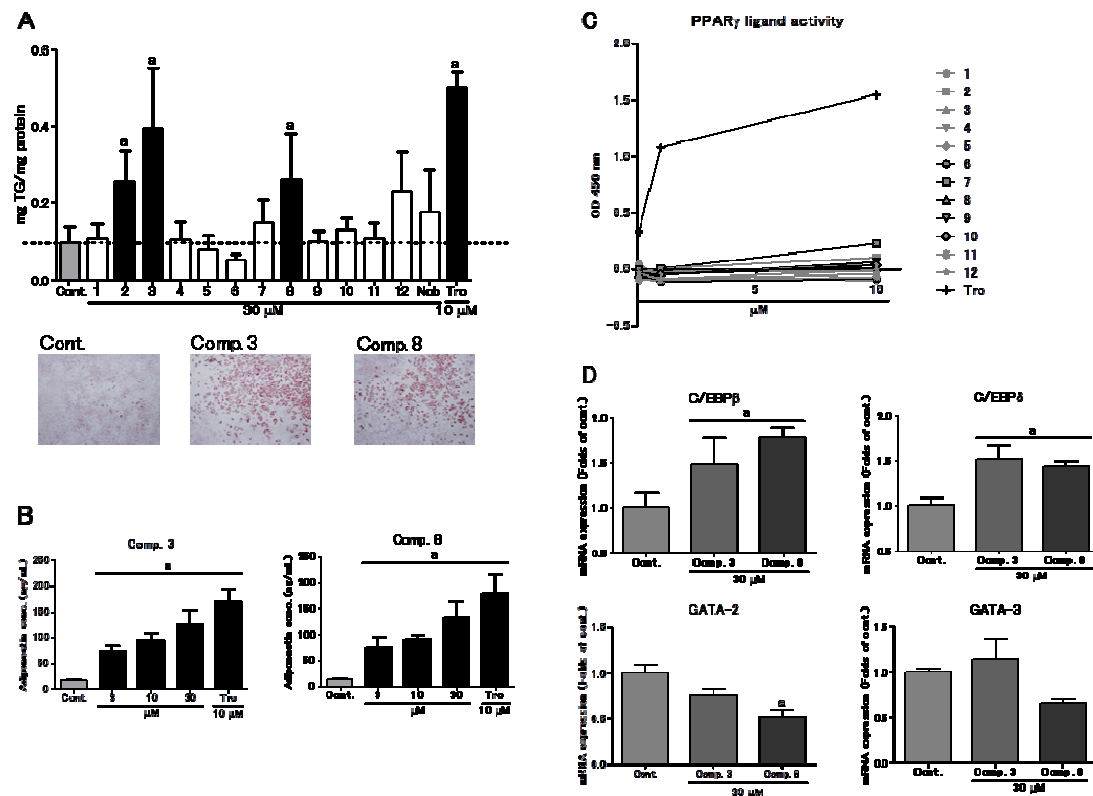
<sup>a</sup>Significantly different from the TSOD control group at  $p < 0.05$ .

**Table 3.** The structure of flavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* (Kp).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Comp. 1 (5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H
Comp. 2 (3,5,7-trimethoxyflavone)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
Comp. 3 (3,5,7,4'-tetramethoxyflavone)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
Comp. 4 (5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
Comp. 5 (5,7-dimethoxyflavone)	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
Comp. 6 (5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone)	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
Comp. 7 (5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Comp. 8 (3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Comp. 9 (5-hydroxy-7-methoxyflavone)	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H
Comp. 10 (5,7,4'-trimethoxyflavone)	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
Comp. 11 (5,3'-dihydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Comp. 12 (5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone)	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH

*In vivo* で内臓脂肪および皮下脂肪蓄積抑制、血漿中 adiponectin 値上昇が示されたことから、KpE は脂肪組織に効果を示していると考え、3T3-L1 細胞を用いて検討を行った。はじめに脂肪前駆細胞に対して検討した結果、KpE で処置した細胞は KpE を含まないコントロールと比較して細胞内 triglyceride (TG) 量を有意に増加させ、脂肪細胞への形態的変化も観察された。さらに単離した化合物のうち、Comp. 3: 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone、Comp. 8: 3,5,7,3',4'-penta- methoxyflavone は adiponectin 分泌量を増加させ、強い分化誘導効果を示した。その機序は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  のリガンド作用ではなく、PPAR $\gamma$  の上流に位置する転写因子の発現制御であると示唆された (Figure 2)。



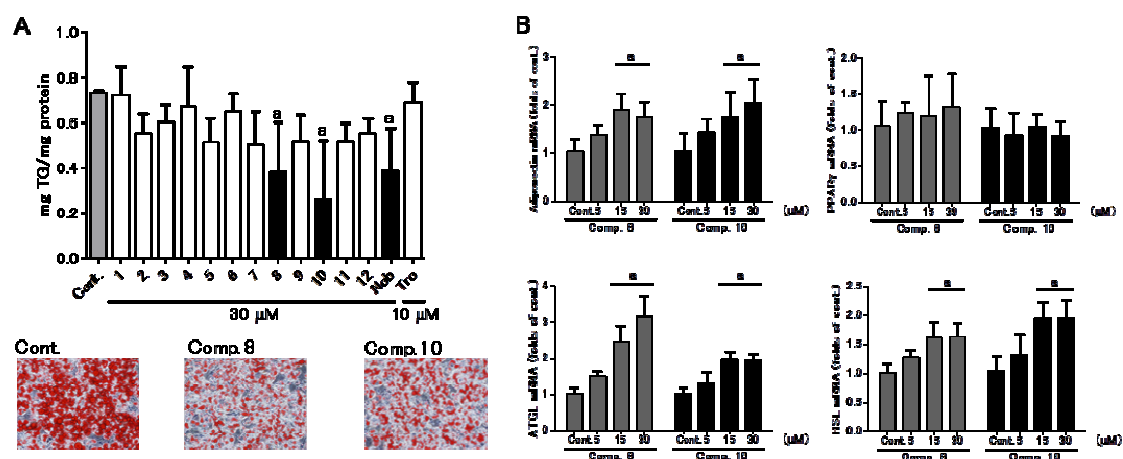
**Figure 2.** The effects of Kp flavonoids on differentiation of 3T3-L1 preadipocyte to adipocyte. **A:** TG concentration and Oil red O staining, **B:** release of adiponectin into media, **C:** PPAR $\gamma$  ligand activity and **D:** the expression of transcription factors mRNA located upstream of PPAR $\gamma$ .

Abbreviation Tro: troglitazone.

The values are expressed as mean  $\pm$ SD (n = 3-4)

<sup>a</sup>Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

続いて、成熟脂肪細胞に対して検討した結果、KpE で処置した細胞はコントロールと比較して有意に細胞内 TG 量を低下させ、adiponectin mRNA 発現を有意に上昇させた。さらに、Comp. 10: 5,7,4'-trimethoxyflavone、Comp. 8: 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone は強く細胞内 TG 量を低下させ、脂質分解酵素の adipose triglyceride lipase (ATGL)、hormone-sensitive lipase (HSL) mRNA 発現レベルを上昇させたことから、これら化合物は細胞内の脂質分解を促進して脂肪細胞の肥大化を抑制していることが示唆された。以上の結果から、KpE は脂肪細胞に対して脂肪細胞分化誘導効果と脂肪分解促進による脂肪細胞肥大化抑制効果を示し、脂肪組織内に小型脂肪細胞の数を増加させ、結果として組織内の環境を通常の状態まで改善することが示唆された (Figure 3)。



**Figure 3. The effects of Kp flavonoids on lipolysis of 3T3-L1 mature adipocyte.**

**A: TG concentration and Oil red O staining and B: the expression of mRNA involved in lipolysis and adiponectin.**

Abbreviation Tro: troglitazone, Nob: nobiletin.

The values are expressed as mean  $\pm$ SD (n = 4)

<sup>a</sup>Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

### 【結論】

以上の結果より、Kp 根茎で認められた TSOD マウスに対する抗肥満作用は、Kp 中に含有されるポリメトキシフラボノイドが活性本体として作用していることが明らかとなった。ポリメトキシフラボノイドは脂肪組織に作用し、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化誘導効果および脂肪分解促進作用による脂肪細胞肥大化抑制効果により、組織内の小型脂肪細胞の数を増大させることが示され、この効果が抗肥満活性の機序に少なくとも寄与していることが示唆された。また、Kp より単離した 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone は脂肪組織において、両作用を発揮することから、脂肪組織内の環境を改善する代謝性疾患予防薬および治療薬として有望な化合物であると考えられる。



## 学位論文審査報告書（甲）

### 1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

*Kaempferia parviflora* の代謝性疾患に対する予防効果および作用機序解明

### 2. 論文提出者 (1) 所 属 生命科学 専攻 分子作用学 講座

(2) 氏 名 ほりかわ たくみ  
堀川 琢心

### 3. 審査結果の要旨（600～650 字）

*Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker は東南アジア地域で滋養強壮や体力回復などを目的に民間薬として広く使用されている伝承生薬である。本研究は、*K. parviflora* の抗肥満作用とその作用機序解明を目的として検討を行った結果、以下のような成果を得た。

- 1) *K. parviflora* の酢酸エチルエキス (KpE) は、TSOD 肥満モデルマウスに対して体重増加抑制、内臓および皮下脂肪蓄積抑制、高血圧改善、血糖値、血漿中インスリン値低下、血漿中 adiponectin 値上昇、耐糖能改善、肝臓中脂質低下などを示した。
- 2) 次いで、KpE について成分探索を行った結果、12 種のポリメトキシフラボノイドを単離、構造決定した。
- 3) 単離した化合物のうち、3,5,7,4'-tetramethoxyflavone、3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone は adiponectin 分泌量を増加させ、脂肪細胞に対して強い分化誘導効果を示した。
- 4) また、5,7,4'-trimethoxyflavone、3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone は脂質分解酵素の adipose triglyceride lipase と hormone-sensitive lipase の mRNA 発現を上昇させたことから、これら化合物は細胞内の脂質分解を促進し、脂肪細胞の肥大化を抑制していることが示唆された。

以上の結果より、*K. parviflora* の抗肥満作用は、これに含有されるポリメトキシフラボノイドが活性本体として作用していることが明らかとなった。ポリメトキシフラボノイドは脂肪組織に作用し、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化誘導効果および脂肪分解促進作用による脂肪細胞肥大化抑制効果により、組織内の小型脂肪細胞の数を増大させることが示され、この効果が抗肥満活性の機序に寄与していることが示唆された。特に、3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone は脂肪細胞の分化誘導と細胞内脂肪分解促進の両作用を有することから、代謝性疾患予防薬および治療薬として有望なシード化合物となり得ることを示した意義ある研究と評価され、博士(薬学)論文に値すると判定された。

### 4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) 合 格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博 士 ( 薬 学 )